

令和 5 年 10 月 24 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11522

研究課題名(和文) 間質細胞の分泌するエクソソーム中microRNAを応用した新たな神経芽腫治療法

研究課題名(英文) New therapeutic strategies using a micro RNA in the stromal cell-derived exosomes

研究代表者

吉澤 穰治 (Jyoji, Yoshizawa)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：80261220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：進行性神経芽腫の治療成績を劇的に改善するには、新しい治療法の開発が必要です。他の多くの悪性腫瘍で発現するマイクロRNAに関する研究は、近年大幅に増加しています。そこで本研究では、神経芽腫の転移や増殖に深く関与するマイクロRNAを新たな治療法として利用することを目指して研究を進めていました。研究の初年度では、培養ヒト神経芽腫細胞で特異的に発現するマイクロRNAと、個体発生中に発現するマイクロRNAを抽出しました。その後、新型コロナウイルス感染症の影響や研究者の所属施設の移転により、予定していた研究が大幅に遅れ、満足な研究成果は得られませんでした。今後も継続して研究を続けていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性神経芽腫の治療成績を飛躍的に向上させるための新たな治療法として、神経芽腫の転移・増殖に深く関与するマイクロRNAを担癌状態の個体へ投与する治療法が有効であるかを検討することが本研究の目標であった。残念ながら、諸般の事情で本治療法の可能性を示唆する有効な情報を得ることができなかったが、学術的意義は高く、今後も継続して研究を続けていきたい。

研究成果の概要(英文)：A new treatment is necessary to dramatically improve the outcome of advanced neuroblastoma. The microRNAs research has expressed in many other malignant tumors in recent years. Therefore, in this study, we have been conducting research with the aim of using microRNAs, which are deeply involved in the metastasis and proliferation of neuroblastoma, as new treatments. In the first research year, we have extracted microRNAs that are specifically expressed in human neuroblastoma cell lines and fetus in rat and mouse. After that, due to the COVID-19 and the relocation of the researcher's affiliated facility, the planned research was significantly delayed, and satisfactory research results were not obtained.

研究分野：小児外科学

キーワード：神経芽腫 microRNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫の悪性度を左右する増殖・転移に関わるエピジェネティックな因子であるエクソソーム中 **microRNA** を血液検査で検出する研究を行ってきた。この研究をさらに発展させて、**microRNA** を用いた神経芽腫の新たな治療法の研究を計画した。これまでの研究は主として、神経芽腫細胞そのものを標的とした研究であったが、近年注目されている神経芽腫周囲の間質細胞へと視点を向けた。

がん間質細胞は、がん細胞の増殖・生存能・浸潤能・転移能といった悪性像に決定的な影響を与える。すなわち、がんの悪性度は、がん細胞自身が有する遺伝的、生物学的因子(内因性因子)だけではなく、がん間質細胞が分泌する因子(外因性因子)によって規定されるということである。がん細胞とがん間質細胞とは、エクソソームなどの液性因子を介して相互に情報伝達を行っている。そして、がん間質細胞が分泌するエクソソーム中の **microRNA** を制御することで、がんの悪性度をコントロールできることがわかってきた。

### 2. 研究の目的

神経芽腫の悪性度を制御するがん間質細胞が分泌するエクソソーム中の様々な **microRNA** を神経芽腫担癌マウスモデルおよび転移マウスモデルに投与して、腫瘍縮小効果や転移抑制効果を検討する。

**microRNA** を用いた治療法の基本的な考えとしては、「**microRNA** の発現異常を正常にもどす。」ということである。すなわち、発現が低下している **microRNA** そのものを補充して、過剰に発現している **microRNA** は抑制するということである。**microRNA** の発現を抑制する方法は、標的 **microRNA** の相補配列を作用させるアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)を形成して、これを投与する方法である。**microRNA** を目的部位への効率よく投与する方法として、アテロコラーゲンやコレステロールを用いたデリバリー法を用いる予定である。また、血中や細胞内に含まれるヌクレアーゼに対する耐性向上のため、2' F, 2' -O-methyl(2' -O-Me), 2' -O-methoxyethyl(2' -MOE)などの化学修飾体、locked nucleic acid(LNA), peptide nucleic acid(PNA)などの核酸類縁体に置き換えた分子も作成する。

平成 29 年度には、がん組織内にある主たるがん間質細胞であるがん関連繊維芽細胞(cancer-associated fibroblasts:CAFs)が分泌するエクソソーム中の **microRNA** について抗腫瘍効果・転移抑制効果について検討する。

がん間質細胞はがん細胞との相互作用により新たな生物像を獲得して、がん細胞から離れた状況でも持続し、がん進展に重要な役割を果たしている。特にがん間質組織内に存在する繊維芽細胞は cancer associated fibroblasts(CAFs)と呼ばれていて、細胞外マトリックスの再構成を誘導し、desmoplastic reaction と呼ばれる間質反応を引き起こしている。こうした間質反応は、がん組織の再構成に重要な役割を果たしている。近年の研究から CAFs によるがん組織再構成は、がん細胞の増殖・浸潤に決定的な影響を与えている可能性が見いだされた。CAFs に関する **microRNA** としては、miR-200 ファミリーが注目されている。

平成 30 年度には、低酸素環境が制御するがん転移に関与する **microRNA** について解析する。われわれは、低酸素状況下でヒト神経芽腫細胞を用いて、腫瘍増大過程において、どの miRNA の発現が増加するのか、或いは減少するのかを 663 種類の miRNA に対して分析して、その結果を発表した。(Yamagata T, Yoshizawa J, et al. Expression patterns of microRNAs are altered in hypoxic human neuroblastoma cells. *Pediatr Surg Int.* 2010 Dec;26(12):1179-84. Epub 2010 Aug 31.)。われわれの結果からも多くの **microRNA** が低酸素環境で発現するかが明らかになったが、miR-210 は他の腫瘍の研究からの低酸素状況下で、過剰発現していることがわかってきた。miR-210 は過剰発現すると VEGF の抑制因子である ephrin-A3 と phospho-tyrosine phosphatase-1B を標的とすることにより血管新生を促進している。

平成 31 年度には、骨転移制御に関与する **microRNA** について解析する。

miR-33a は破骨細胞による骨吸収を促進する PTHrP を標的とすることによって骨転移を抑制する因子として働いており、肺がんのがん細胞においては、miR-33a が抑制されていることが示されている。miR-34a は破骨細胞の分化に抑制的に働くが、miR-34a トランスジェニックマウスモデルでは Tgif2 が阻害されることにより乳がんや皮膚がんの転移を減少させた。また、miR-133a は Mitf Mmp14 を標的として、同様に mir-141 は mitf と Calcr を、miR-190 は Calcr を、miR-219 は Mitf と Traf6 を標的として、破骨細胞の異なる分化段階を制御している。これらの **microRNA** は破骨細胞の分化を抑制して、骨転移を阻害することがわかっている。

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

これまでに神経芽腫以外の腫瘍に関しては、エクソソーム中 **microRNA** を応用した治療研究が活発に行なわれているが、神経芽腫においては、治療を目的としたエクソソーム中 **microRNA** の研究成果がほとんど得られていないことから、飛躍的な治療成績向上がない神経芽腫治療に有用な研究と考えている。また、研究方法もこれまでにわれわれが行ってきた手法・研究結果に基づいて計画したものであり、その実現性は極めて高いと考える。

### 3. 研究の方法

平成 29 年度には、がん間質細胞として大きな役割を果たしている線維芽細胞の分泌するエクソソームに含有される腫瘍増殖・転移に関与する microRNA ( miR-200 ファミリー:miR-200a, miR-200b, miR200c, miR-141, miR-429 および miR-9) をアテロコラーゲンやコレステロールと混和して、担癌マウスモデルや転移モデルに投与して、その効果を in vivo で検討した。投与にあたっては、至適 microRNA 濃度、投与容量、投与回数などを決定するためには、様々な条件下での都検討が必要であった。

マウス神経芽腫細胞 (C1300)・ヒト神経芽腫細胞 (NB-1, IMR-32, TN-2, TNB1) を用いた。平成 30 年以降は、低酸素環境で発現する microRNA (miR-210) や骨転移に関与する (microRNA, miR-33a, miR-34a, miR-133a, miR-141, miR-190, miR-219) をアテロコラーゲンやコレステロールと混和して、担癌マウスモデルや転移モデルに投与して、これらの抗腫瘍・抗転移効果を in vivo で検討する予定であった。

まず、miR-210 をターゲットに選択した理由は以下の通りである。低酸素によってその発現が誘導される転移因子 HIF1 $\alpha$  は、血管新生を促進することにより転移経路の確保に関与している。さらに、HIF1 $\alpha$  は様々な経路を介して、EMT を引き起こすことが知られている。低酸素環境により HIF1 $\alpha$  が誘導されると miR-210 が過剰発現し、VEGF の抑制因子である ephrin-A3 と phosphotyrosine phosphatase-1B を標的とすることにより血管新生が促進される。miR-210 は細胞の移動や浸潤を阻害する vacuole membrane protein 1 を抑制して、がん細胞の転移を促進するという報告がある。

### 4. 研究成果

研究開始前年までは、血液中のエクソソームから microRNA を抽出して、その種類や増減を検出して、神経芽腫の診断に利用することを目標にした研究を実施した。研究 1 年目には、これを継続・発展させるため、神経芽腫に特異的に発現し、検疫機能の活性化に関与する mi cro RNA を選定して、これを多量に作成して濃縮して、エクソソームに包埋することを試みた。さらに、神経芽腫担癌状態のマウスに高濃度の mi croRNA を包埋したエクソソームを静脈内投与して、腫瘍の縮小効果を検討する予定であった。

エクソソームは、A/J マウスの日齢 3, 7 日、週齢 2, 3, 4 週、月齢 2, 3 か月のマウスの血液を採取して抽出している。一方、血中エクソソームの mi croRNA をがんの診断に用いる研究が大腸がんにおいて報告が多いため、ラット大腸がんを用いた研究を並行して行った。これによって、研究方法の正確性を確認しながら、目的である神経芽腫の血中エクソソームの microRNA の解析を行うこととした。ラットの大腸がん細胞である RCN-9 細胞を用いて、大腸がん肝転移モデルと担がんモデルを作製して、血液を採取して、エクソソームの抽出と mi croRNA の抽出をおこなった。大腸がん特有で、免疫機能活性効果のある血中エクソソーム中の microRNA と神経芽腫細胞において特異的に発現している mi croRNA との相違を検討して、どの microRNA が神経芽腫治療に効果的であるかを検討しながら、研究をすすめる予定であった。

研究 2 年目以降は、新型コロナウイルス感染症の拡大防止と研究代表者の所属施設の移動のため、当初の予定した研究が大幅に遅延し、残念ながら、その後には、有意義な研究結果を得ることができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------